

**PRIMENA ENZIMSKOG IMUNOTESTA ZA ODREĐIVANJE
KONCENTRACIJE PROGESTERONA U PUNOM KRAVLJEM
MLEKU***

*APPLYING ENZYME IMMUNOTEST FOR DETERMINATION OF
PROGESTERONE CONCENTRATION IN WHOLE COW'S MILK*

**A. Milovanović, M. Jovičin, T. Barna, Snežana Golubović, V. Resanović,
V. Rodić, Smiljka Kitanović, M. Lazarević****

U ovom radu prikazani su rezultati primene našeg novog enzimskog imunosorbent testa (EIA) za direktno određivanje koncentracije progesterona u punom mleku krava.

Testom su potvrđene visoke koncentracije u mleku kod steonih krava ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) i niske koncentracije kod nesteonih krava ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n=8$).

Ovim progesteronskim testom se u uzorcima mleka mogu pouzdano pratiti variranja u koncentraciji progesterona po danima ciklusa krava, ako se uzorci uzimaju svakog drugog dana. U radu su prikazani i progesteronski profili steonih i nesteonih krava, kao i profili onih sa poremećenim ciklusom i sa greškom u osemenjavanju. Rezultati dobijeni EIA testom su upoređivani sa rezultatima dobijenim komercijalnim RIA-progesteronskim setom iz uzoraka krvnog seruma.

Razlike u koncentraciji progesterona u 15 uzoraka mleka krava novoprodučenim EIA testom i koncentraciji određivanoj komercijalnim EIA testom nisu bile statistički značajne (t-test: $t=0,1144$; $p=0,9097$).

U uzorcima mleka čuvanim na temperaturi frižidera ($+4^{\circ}\text{C}$) konzervisanim kalijum bihromatom (do 28. dana nakon muže) ustanovljene su niže koncentracije progesterona za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) u odnosu na koncentraciju na dan muže, što u krajnjem ishodu ipak nije uticalo na dobijene kliničke rezultate. Za primenu u EIA

* Rad primljen za štampu 18. 02. 2009. godine

** Mr sci. med. vet. Aleksandar Milovanović, dr sci. med. vet. Milovan Jovičin, Tomislav Barna, dr vet. med. Naučni institut za veterinarstvo, "Novi Sad", Novi Sad; mr sci. Snežana Golubović, dr sci. Vojislav Resanović, Institut za primenu nuklearne energije - INEP, Zemun; mr sci. Vladimir Rodić, dr sci. Smiljka Kitanović, saradnici na projektu; dr sci. med. vet. Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

testu uzorci mleka sa konzervansom mogu se skladištiti četiri nedelje u frižideru.

Ključne reči: progesteron, EIA, mleko, krave

Uvod / Introduction

Uspeh u reprodukciji zavisi od niza činilaca koji, na kraju mogu da imaju dva moguća izlazna rezultata: uspeh – steona ili neuspeh – nesteona plotkinja. Reprodukcija u stadu zavisi od niza činilaca, kao što su količine proizvedenog mleka, ocene telesne kondicije, ishrane, uslova smeštaja, načina držanja, postupaka u otkrivanju estrusa i poremećenih ciklusa, grešaka u rukovanju semenom, tehnike osemenjavanja, vođenja puerperijuma, stepena angažovanosti radne snage itd. Pri tome, svaka, pa čak i mala greška, može da ima kumulativni efekat na celokupnu reprodukciju stada. Zbog toga, što ranija, pouzdana dijagnoza steonosti, može znatno da doprinese poboljšanju reproduktivnih pokazatelja (Braun, 1986; Butler, 2001; Jovičin i sar., 2003; Shresta i sar., 2004).

Određivanje koncentracije progesterona u krvnoj plazmi ljudi i životinja započeli su 1957. godine Short i saradnici (1957), a Robertson i Sarda (1971) su detaljno analizirali promene u koncentraciji ovog hormona kod više vrsta domaćih životinja. Iste godine, Laing i Heap (1971) su dokazali da koncentracija progesterona u mleku proporcionalno sledi njegovu koncentraciju u krvnoj plazmi. Od tada, brojni autori ukazuju na prednosti merenja koncentracije progesterona u mleku u cilju monitoringa reproduktivnog statusa krava (Nakao i sar., 1983; Wimpy i sar., 1986; Shrestha i sar., 2004).

Kontrola plodnosti krava i junica EIA testom za direktno određivanje koncentracije progesterona iz punog mleka i krvnog seruma je vrlo osetljiv i praktičan način monitoringa reprodukcije krava. Kontrola plodnosti krava na ovaj način je privilegija samo malog broja razvijenih zemalja, upravo zbog poteškoća u proizvodnji komponenata EIA testa dovoljne specifičnosti i osetljivosti. Prema dosadašnjim rezultatima, institucije koje su u prilici da organizuju ispitivanja ove vrste, uspešnije se nose sa problemima steriliteta, naročito na farmama sa velikim brojem mlečnih krava.

Uslužne komercijalne laboratorije u kojima se određuje koncentracija progesterona najpre su započele sa radom sedamdesetih godina u Zapadnoj Nemačkoj (Hoffman, 1976) i Velikoj Britaniji (Booth, 1979) formiranjem centralnih laboratorija u koje su pristizale na desetine hiljada uzoraka mleka godišnje.

U našoj zemlji objavljeno je nekoliko radova o određivanju koncentracije progesterona kod krava. Uglavnom je korišćen radioimunološki test (RIA) (Kuzmanov i sar., 1981; Kovačević i sar., 1988; Vučko i Potočnjak, 1988; Đurđević i sar., 1990), a u manjoj meri enzimski test (EIA) (Đurđević i sar., 1990; Vuković i sar., 1991). Iako je RIA metod pouzdan i tačan, postoji niz ograničenja usled korišćenja radioaktivnih izotopa, cene uređaja i problema odlaganja radioaktivnog otpada.

Zbog toga se RIA metod koristi samo u institucijama koje ispunjavaju stroge normative bezbednosti, opremljenosti i kadrova.

Kvantitativni testovi bazirani na EIA metodi pokazali su različite i nekoherentne rezultate (Đurđević i sar., 1990). U našim uslovima, njihova upotreba je ostala u domenu kontrole kvaliteta drugih komercijalnih semikvantitativnih testova ili u sklopu kratkoročnih projekata, bez tendencije da se progesteronski test uvede kao redovna mera kontrole u reprodukciji krava. Komercijalno određivanje koncentracije progesterona u mleku krava uz formiranje centralne laboratorije u koju bi se usmeravao veći broj uzoraka do sada nije zaživelo u našoj zemlji.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Cilj našeg rada je bio ispitivanje mogućnosti proizvodnje, uvođenja i komercijalnog korišćenja EIA testa (u daljem tekstu EIA-PRG) za direktno određivanje koncentracije progesterona u punom mleku krava. Tehnika proizvodnje progesteronskog testa je savladavana u saradnji sa istraživačima iz Japana (Departman veterinarske medicine, Laboratorija za reprodukciju Poljoprivrednog fakulteta, Jamaguči Univerzitet, Japan). Istraživanja su izvršena u dve faze u periodu od januara 2005. godine do decembra 2007. godine.

I faza – terenski rad

1. Jednokratno uzorkovanje mleka i krvi krava od definisanih grupa plotkinja (pouzdana steone i pouzdano nesteone krave u estrusu) (farme A i B).
2. Uzorkovanje mleka i krvi svakog drugog dana (13 uzoraka) u cilju praćenja polnog ciklusa i utvrđivanja rezultata osemenjavanja – od 0. do 25. dana ciklusa i definisanje grupa (steona/nesteona) (farma B).

II faza – laboratorijski rad

1. Formiranje EIA-PRG testa.
2. Merenje koncentracije progesterona u uzorcima mleka i seruma definisanih grupa krava (pouzdana steone i pouzdano nesteone).
3. Provera EIA-PRG testa u uzorcima mleka i seruma krava uzetih svakog drugog dana u cilju praćenja polnog ciklusa i rezultata osemenjavanja. Rezultati su upoređivani sa rezultatima dobijenim RIA-PRG (RIA-progesteronskim testom proizvedenim u INEP-u, Zemun) iz uzoraka krvnog seruma.

Kontrola stabilnosti progesterona u mleku konzervisanog kalijum bihromatom nakon 28 dana od uzimanja uzoraka, testiranjem sa EIA-PRG i kontrolom komercijalnim EIA OvuCheck® Milk testom (Biovet Inc., Kanada).

Ogledne životinje / Experimental animals

Ogled je sproveden na dve komercijalne farme u okolini Novog Sada (farma A sa 200 krava na muži; farma B sa 150 krava na muži). Krave u ogledu su držane u vezanom sistemu i hranjene senom lucerke, silažom kukuruza uz dodatak 5-7 kg koncentrata sa 16% sirovih proteina. Krave su bile u laktaciji od 60 do 180. dana i mužene su dva puta dnevno. Prosečna proizvodnja mleka na obe farme, obračunata na 305 dana laktacije, iznosila je oko 6500 kg. Na farmi A estrus je detektovan na osnovu spoljašnjih znakova estrusa, dok je na farmi B estrus otkrivan i rektalnim pregledom.

Klinička ispitivanja krava / Clinical examinations of cows

Pre uzimanja uzoraka krave u estrusu su rektalno pregledane radi eliminacije plotkinja sa kliničkim znacima endometritisa. Provera steonosti izvršena je ultrazvučnim aparatom Siui, Shantou, Kina upotrebom rektalne sonde od 7,5 MHz, 27-35. dana nakon osemenjavanja. Ovaj nalaz je ponovo potvrđen rektalnim pregledom 60. dana posle osemenjavanja.

Prikupljanje uzoraka mleka i krvnog seruma / Collecting samples of milk and blood serum

Na farmi A uzeto je 18 uzoraka punog mleka, pri čemu je 10 krava bilo steono (potvrđeno rektalnim pregledom sa ≥ 60 dana steonosti), a od 8 krava uzorci su uzimani na dan osemenjavanja (1. dan ciklusa), pre večernje muže. Uzorkovano je oko 8 ml mleka iz klinički zdravih četvrti u plastične epruvete zapremine 10 ml (Spektar, Čačak). Kao konzervans korišćene su tablete sa 3,3 mg kalijum-bihromata (Merck, Darmstadt, Nemačka). Prvi mlazevi mleka iz svake četvrti su odbačeni, a potom je namužena približno jednaka količina mleka iz svake zdrave četvrti. Uzorci su čuvani u frižideru na $+4^{\circ}\text{C}$ do momenta izvođenja analiza.

Na farmi B, uzorci punog mleka uzimani su na početku večernje muže od 10 krava na dan osemenjavanja (1. dan ciklusa), a zatim svaki drugi dan još 12 puta. Tako je poslednji uzorak uzet 25. dana od osemenjavanja. Uzorkovanje mleka, njegovo konzervisanje i skladištenje je bilo istovetno kao sa uzorcima sa farme A.

Uzorci krvi za određivanje koncentracije progesterona takođe su uzimani 13 puta i to svaki drugi dan, zajedno sa uzimanjem mleka (neposredno posle jutarnje muže) punkcijom *v. coccigealis* u vakutajnere zapremine 10 ml (BD Vacutainer, Plymouth, UK). Sutradan, nakon izdvajanja seruma, odlivano je po 1 ml krvnog seruma u plastične ependorf epruvete zapremine 1,5 ml, a uzorci su čuvani na -20°C do momenta izvođenja analiza.

U drugom delu ogleada na farmi B, koncentracije progesterona u 15 uzoraka mleka paralelno je određena sa EIA-PRG testom i komercijalnim EIA OvuCheck® Milk testom (Kanada).

Nakon 28 dana od prvog merenja, urađena je ponovna analiza istih uzoraka istim testovima radi utvrđivanja stabilnosti progesterona u uzorcima mleka konzervisanih na temperaturi od +4 °C.

Izvođenje enzimskog testa / Applying enzyme test

Priprema uzoraka: Uzorci mleka su zagrevani na temperaturi od 45°C tokom 20 minuta u suvom termostatu, a zatim su homogenizovani pomoću vorteks mešalice (EV-102, Tehnica, Železniki, Slovenija) tokom 30 sekundi. Iz tako pripremljenih uzoraka, odlivano je po 20 µl u ependorf epruvete od 1,5 ml. Ova količina je razblažena sa po 780 µl fosfatnog pufera koji je sadržavao 0,1% goveđeg serum albumina, frakcija V (Sigma-Aldrich, Sent Louis, SAD). Na ovaj način, uzorci mleka su bili ukupno razblaženi 40 puta čime je neutralisan nepovoljan uticaj mlečne masti koja otežava očitavanje reakcije. Ovim postupkom se izbegava procedura obiranja mleka, test je tehnički jednostavniji i proceduralno brži, što je bitno radi blagovremenog slanja rezultata na farmu.

Oblaganje ploča: Mikrotitarske ploče (Maxi-Sorb, Nunc, Roskilde, Danska) su oblagane anti-kunić IgG antitelima (MP Biomedicals Inc, Ohio, SAD) u koncentraciji od 4 µg/ml sa po 100 µl po otvoru. Antitela su prethodno razblažena u karbonatnom puferu (pH = 9,7). Mikrotitar ploče pokrivene su lepljivom folijom i inkubirane sa rastvorom antitela tokom 48 sati na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje na 300 obrtaja u minuti pomoću termomiksera (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka).

Ploče su zatim ispirane tri puta sa po 300 µl 0,9% rastvora NaCl po otvoru, pomoću automatskog ispirača ploča (Assys Hitech, Austrija) i dobro su istresene radi uklanjanja zaostale tečnosti iz otvora.

Blokiranje ploča: Blokiranje nezasićenih mesta na površini otvora ploča je izvršeno inkubiranjem sa 200µl rastvora za blokiranje po otvoru, tokom 2 sata na sobnoj temperaturi uz blago mešanje na 300 obrtaja u minuti.

Rastvor za blokiranje bio je 3% rastvor saharoze i 0,1% goveđeg serum albumin u 0,05 M fosfatnom puferu pH 7,4. Zatim su ploče ispirane 3 puta sa po 300 µl fosfatnog pufera po komorici i ostavljene da se osuše preko noći. Ukoliko ploče nisu korišćene istog dana, bile su zapakovane u vakuumirane plastične folije i čuvane u frižideru.

Testiranje uzoraka: U jedan niz otvora obložene ploče dodavano je po 50 µl rastvora standarda progesterona u koncentracijama od 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 i 30 ng/ml. Rastvaranje je vršeno u mleku krave koja je pouzdano bila u estrusu i koje je imalo nisku koncentraciju progesterona.

U sledeće redove otvora dodavano je po 50 µl pripremljenih uzoraka mleka. Zatim je u svaki korišćeni otvor dodato po 50 µl razblažen progesteron obeležen peroksidazom HRP (HRP-P4), a zatim po 50 µl rastvorenih antiprogesteronskih antitela (konačno razblaženje HRP-obeleženog progesterona je bilo

50.000 ×, a antiprogesteronskih antitela 100.000 × u odnosu na dobijene koncentrate*.

Ploče su pokrивane lepljivom folijom da bi se sprečilo isparavanje sadržaja i inkubirane su četiri sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarske ploče su ispirane fosfatnim puferom 3 puta. Kao supstrat i hromogen za razvijanje bojene reakcije korišćeni su rastvori vodonik-peroksida i tetrametilbenzidina – TMB (INEP, Zemun).

Inkubacija se odvijala u mraku, tokom 20 minuta i na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena sa 50 μl prekidača reakcije (2M rastvor H₂SO₄) po ovoru.

Očitavanje rezultata: optička gustina je merena na čitaču ploča (Multiscan MCC/340, Finska), na 450 nm.

Za preračunavanje dobijenih vrednosti optičke gustine u vrednosti progesterona u punomasnom mleku (ng/ml) u odnosu na dobijenu standardnu krivu korišćen je softver GraphPad Prism, Verzija 3.02 (Graph Pad Software, Inc., SAD).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

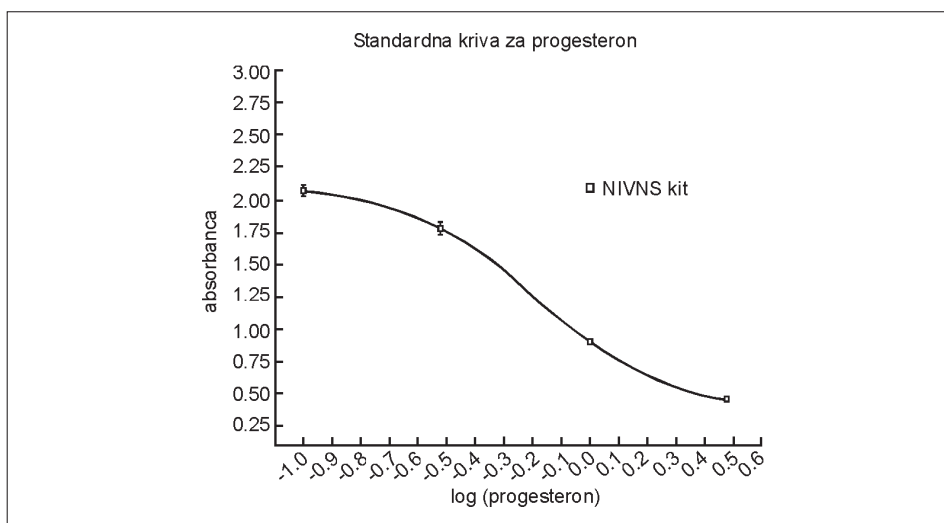
I Standardizacija / I Standardization

Na Grafikonima 1a i 1b prikazane su standardne krive za progesteronski EIA-PRG test proizveden u laboratoriji NIV-NS i za komercijalni OvuCheck test. Standardna kriva je izrađena upotrebom standardnih rastvora progesterona sledećih koncentracija: 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 i 30 ng/ml.

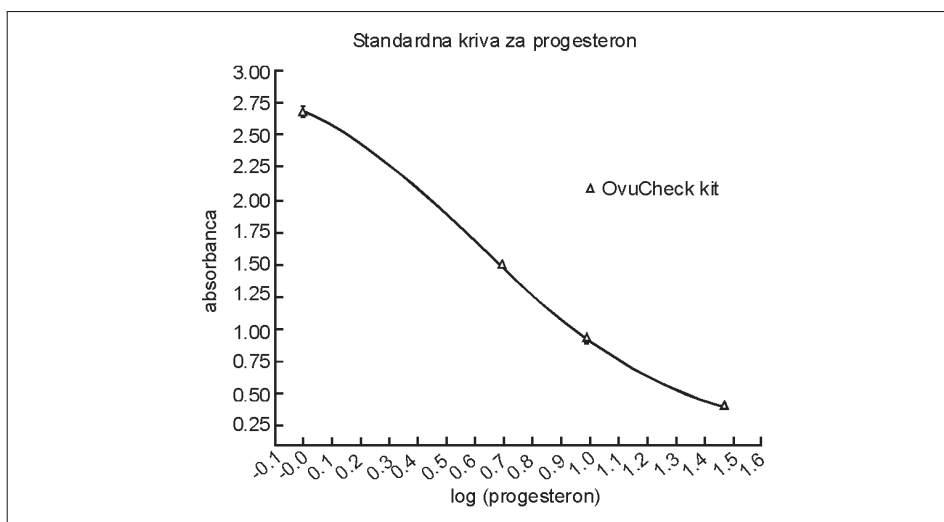
Na Grafikonu 1a i 1b prikazane su standardne krive za EIA-PRG test i OvuCheck EIA konstruisane sa poznatim koncentracijama progesterona. Na osnovu vrednosti apsorbanci uzoraka progesterona preračunavaju se dobijene vrednosti koncentracija progesterona. Da bi u kompetitivnoj EIA bio merljiv što veći raspon koncentracija progesterona, neophodan je visok signal (apsorbanca između 1,5 i 2,0) za standardne rastvore, što je i ostvareno na Grafikonima 1a i 1b. Time se dobija dovoljno strma standardna kriva sa koje je moguće preciznije odrediti koncentracije progesterona u uzorcima.

Za graničnu vrednost koncentracije progesterona u mleku koja predstavlja lutealnu fazu ciklusa, uzeta je koncentracija od 2,0 ng/ml progesterona (Larson i sar., 1987; Samad i sar., 2004). Tako je za krave sa više od 2 ng progesterona /ml mleka smatrano da se nalaze u lutealnoj fazi. Uzorci koji su uzeti od 19. do 23. dana ciklusa, a koji su imali nivo progesterona ispod 2 ng/ml verovatno potiču od krava koje nisu steone, a oni sa 2 ng/ml i više, od steonih plotkinja (odnosno plotkinja koje su u lutealnoj fazi).

* HRP-obeleženi progesteron kao i antiprogesteronska antitela su u vidu koncentrata; dobijena su ljubaznošću prof. dr Tošihiko Nakao, sa Univeziteta u Jamagučiju iz Japana.



Grafikon 1a. Ekstinkciona standardna kriva za progesteron (NIV-NS)
Graph 1a. Extinction standard curve for progesterone (NIV-NS)



Grafikon 1b. Ekstinkciona standardna kriva za progesteron (OvuCheck)
Graph 1b. Extinction standard curve for progesterone (OvuCheck)

*II Farma A: Komparabilnost određivanja progesterona u serumu i mleku /
II Farm A: Comparability of progesterone determination in serum and milk*

Poređenje koncentracija progesterona u punomasnom mleku izmerenih EIA testom sa odgovarajućim koncentracijama progesterona u serumu

izmerenih RIA testom pokazalo je relevantnost određivanja progesterona u mleku kao uzorku. Istovremeno je pokazana i relevantnost EIA metode, koja je korišćena za određivanje progesterona u mleku.

U tabeli 1 su prikazane dobijene vrednosti (\bar{x} , SD) u uzorcima mleka i seruma steonih i nesteonih krava.

Tabela 1. Statističke vrednosti koncentracija progesterona u mleku krava izmerenih EIA-PRG testom i koncentracije progesterona u krvnom serumu izmerene RIA testom / Table 1. Statistical values of progesterone concentration in cow s milk measured using the EIA-PRG test and progesterone concentrations in blood serum measured using the RIA test

Reproduktivni status / <i>Reproductive status</i>	n	\bar{x} (ng/ml)	SD (ng/ml)	S _x	I.V. (ng/ml)
RIA Steone (krvni serum) / <i>RIA Gravid (blood serum)</i>	10	13,16	13,30	4,21	2,70-40,20
EIA-PRG Steone (mleko) / <i>EIA-PRG Gravid (milk)</i>	10	12,92	6,94	2,19	7,00-29,20
RIA Nesteone (krvni serum) / <i>RIA Non-gravid (blood serum)</i>	8	1,35	0,98	0,35	0,30-2,80
EIA-PRG Nesteone (mleko) / <i>EIA-PRG Non-gravid (milk)</i>	8	1,09	0,67	0,24	0,0-1,9

Razlika nije signifikantna kada se poredi koncentracija PRG u punomasnom mleku izmerenih EIA testom u gupi steonih krava sa odgovarajućim koncentracijama PRG u serumu izmerenih RIA testom u gupi steonih krava ($p=0,9602$). Slični rezultati dobijeni su prilikom poređenja grupa nesteonih krava ($p=0,5418$).

The difference is not significant when PRG concentrations in whole cow s milk measuring using the EIA test in the group of gravid cows are compared with corresponding PRG concentrations in serum measured using the RIA test in the group of gravid cows ($p=0.9602$). Similar results were obtained during a comparison of groups of non-gravid cows ($p=0.5418$).

Dobijeni rezultati ukazuju da se merenjem progesterona pomoću EIA-PRG testa iz neobranog, punomasnog mleka krava pouzdano mogu otkriti nesteone krave i potvrditi visoke koncentracije progesterona kod steonih krava.

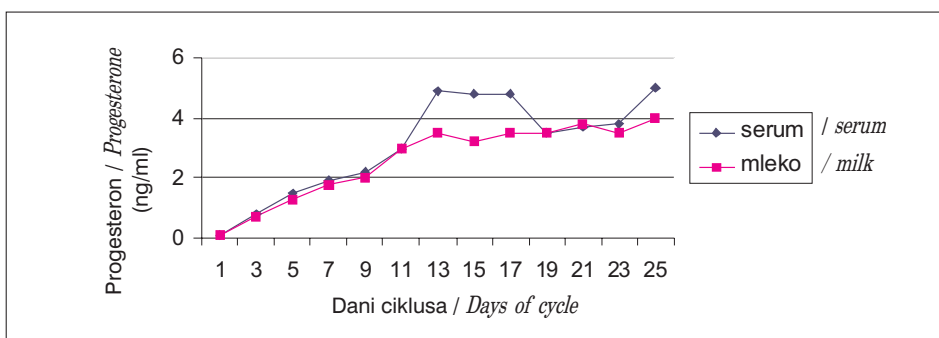
III Farma B: promene koncentracije progesterona po danima ciklusa /

III Farm B: Changes in progesterone concentration according to days of cycle

Progesteronskim testom se precizno mogu pratiti variranja u koncentraciji progesterona u uzorcima mleka po danima ciklusa kod krava od kojih su uzimani uzorci krvi i mleka svaki drugi dan (ukupno 13 puta). Period aktivnosti žutog tela (lutealna faza) traje od 3. dana od osemenjavanja i kod steonih krava nivo progesterona ostaje visok i 16-17. dana ciklusa (Grafikoni 2a i 2b). Kod nesteonih krava sa pravilnim ciklusom, 16-17. dana dolazi do pada koncentracije progesterona (Grafikon 3). Osim toga, test omogućava otkrivanje poremećenih ciklusa (Grafikon 4a) i grešaka u osemenjavanju (Grafikon 4b). Istovremeno, upoređivanje rezultata dobijenih RIA iz uzoraka krvi sa EIA-PRG iz uzoraka mleka

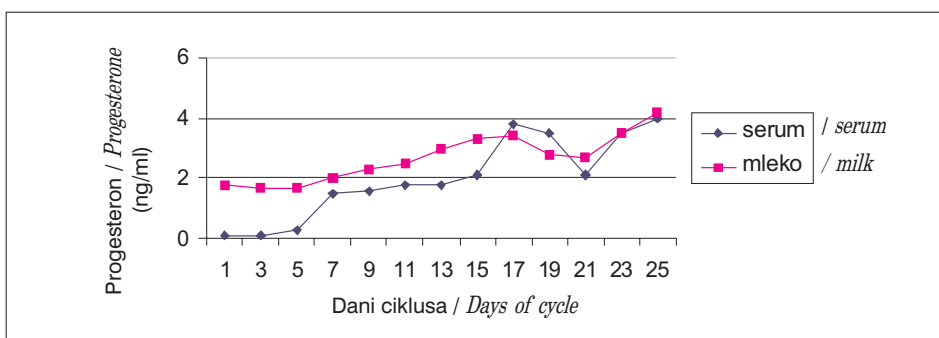
potvrđuju da koncentracija progesterona u mleku proporcionalno sledi koncentraciju progesterona u serumu.

Na grafikonima 2a i 2b su prikazane koncentracije progesterona u krvi određene RIA testom i u mleku određene EIA-PRG testom kod steonih krava (tetovir broj 3619 i 3712). Krave su osemenjene 1. dana ciklusa; progesteron ostaje visok nakon 18. dana ciklusa.



Grafikon 2a. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3619 koja je ostala steona nakon v.o. /

Graph 2a. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.3619 which became gravid following artificial insemination

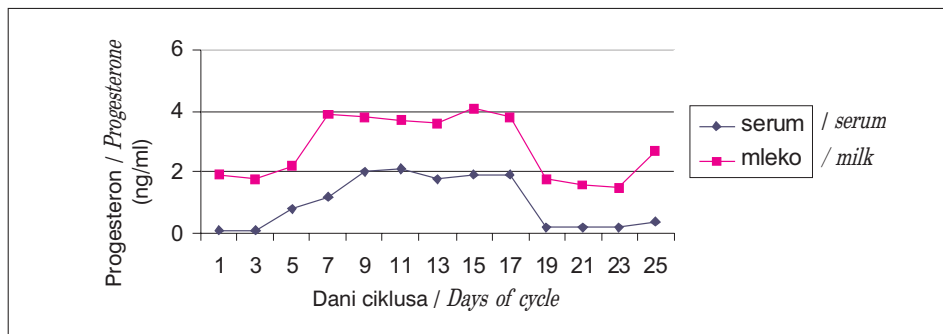


Grafikon 2b. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3752 koja je ostala steona nakon v.o. /

Graph 2b. PRG concentrations per days of cycle for cow t.no.3752 which became gravid following artificial insemination

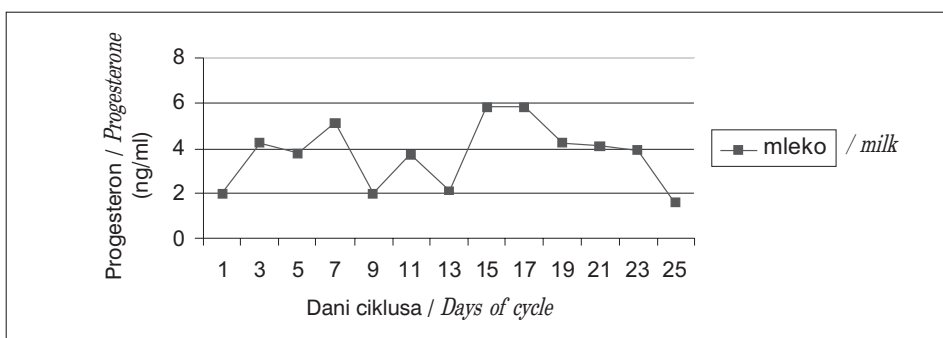
Na grafikonu 3. su prikazane promene u koncentraciji progesterona u krvnom serumu krave određene RIA testom i koncentracije progesterona u mleku određene EIA-PRG testom kod nesterone krave (tetovir broj 4861) sa pravilnim ciklusom. Krava je osemenjena 1. i 21. dana ciklusa. Prema Opsomeru i sar. (1988), normalni ciklusi nakon 50. dana od teljenja odvijaju se kod 53,5% slučajeva, a -

ciklusi sa kratkom lutealnom fazom (<10 dana) mogu se očekivati kod svega 0,5% slučajeva.



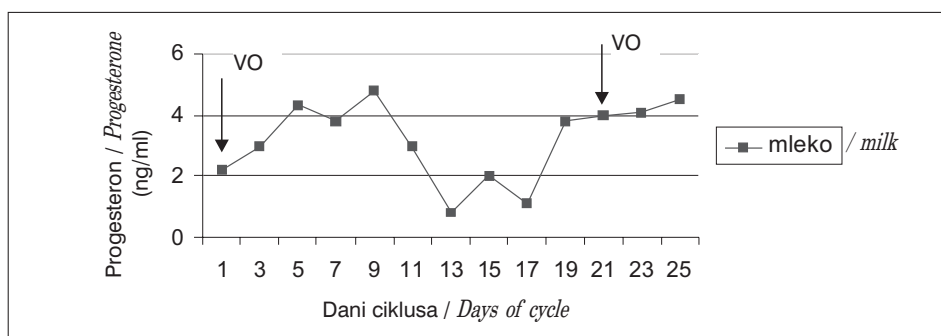
Grafikon 3. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 4861 (krava nije steona) / Graph 3. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.4861 (cow is not gravid)

Na grafikonima 4a. i 4b. su ilustrovane mogućnosti testa za otkrivanje poremećenih ciklusa. Krava tetovir broj 3258 ima niske koncentracije progesterona 1. dana, 9-13. i od 25. dana. Opsomer i sar. (1988) nalaze da se ciklusi sa kratkom lutealnom fazom (<10 dana) mogu očekivati kod svega 0,5% slučajeva.



Grafikon 4a. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3258 (krava sa poremećenim ciklusom) / Graph 4a. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.3258 (cow with irregular cycle)

Na grafikonu 4b. je prikazano korišćenje testa za utvrđivanje nepravovremenog veštačkog osemenjavanja. Krava tetovir broj 4861 je osemenjena i 1. i 21. dana, kada je nivo progesterona bio visok. Prema istraživanju Reimers i sar. (1985), Sturmana i sar. (2000), od 5,1% do 19% krava se osemeni u lutealnoj fazi ciklusa.



Grafikon 4b. Koncentracija PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 4862 (krava je osemeњena u lutealnoj fazi) /

Graph 4b. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.4862 (cow inseminated in luteal phase)

IV Upoređenje EIA-PRG testa proizvedenog u NIV-NS i komercijalnog Ovu Check[®] testa / IV Comparison of EIA-PRG test produced by NIV-NS and commercial OvuCheck[®] test

U drugom delu ogleда na farmi B merene su koncentracije progesterona u 15 uzoraka mleka krava EIA-PRG testom formiranim u NIV-NS i upoređene su sa vrednostima progesterona dobijenim komercijalnim testom (Ovu Check[®] Milk test, Kanada). Rezultati merenja prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Deskriptivne statističke vrednosti izmerenih koncentracija progesterona EIA-PRG testom NIV-NS i komercijalnim testom /

Table 2. Descriptive statistical values of progesterone concentrations measured using the EIA-PRG test of NIV-NS and the commercial test

Progesteronski test / Progesterone test	Broj (n) / Number	Izmerene koncentracije progesterona (ng/ml) / Measured progesterone concentrations (ng/ml)				
		\bar{x}	SD	SE	CV%	I.V.
NIV-NS	15	8,42	5,99	1,55	71,14	2,21-23,87
Ovu-Check	15	8,66	5,46	1,41	63,05	3,14-21,77
Razlika / Difference	-	-0,24	0,53	0,14	8,09	0,08-2,10

Razlike između vrednosti koncentracija progesterona dobijenih testom pomoću seta proizvedenog u NIV-NS i komercijalnim testom iznosila je $6,75 \pm 9,00\%$ ($0,24 \pm 0,68$ ng/ml). Primenom t-testa nisu uočene statistički značajne razlike ($t = 0,1144$; $p = 0,9097$).

U analizi istih 15 uzoraka mleka komercijalnim testom nakon 28. dana skladištenja, koncentracija progesterona je bila smanjena za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) u odnosu na koncentracije na dan muže, što u krajnjem ishodu nema značaja za procenu hormonskog statusa. To govori u prilog tome da se

uzorci mleka konzervisani kalijum-bihromatom mogu skladištiti četiri nedelje u frižideru u slučaju sprovođenja oglada koji ne zahtevaju brze povratne informacije za korisnike rezultata.

Zaključak / Conclusion

Progesteronski kit proizveden u NIV-NS u saradnji sa istraživačima iz INEP-a i Japana ima osobine brzog, pouzdanog i visoko osetljivog testa za merenje progesterona.

Testom su potvrđene visoke koncentracije u mleku kod steonih krava ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) i niske koncentracije kod nesteonih krava ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n = 8$).

U uzorcima mleka koji su uzimani svakog drugog dana mogu se pozdano pratiti variranja u koncentraciji progesterona po danima ciklusa krava. Tako su prikazani profili progesterona steonih i nesteonih krava, kao i kod poremećenih ciklusa i grešaka u osemenjavanju.

Razlike u koncentraciji progesterona u 15 uzoraka mleka krava novo-proizvedenim EIA testom komercijalnim EIA testom nisu bile statistički značajne.

U uzorcima mleka čuvanim na $+4^{\circ}\text{C}$ do 28. dana nakon muže koncentracija progesterona je za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) niža nego u sveže uzetim uzorcima.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je delimično finansiran od strane Ministarstva nauke Republike Srbije po osnovu zadataka iz rada na projektu: Patologija i dijagnostika aktuelnih bolesti životinja koje ugrožavaju javno zdravlje (evidencioni broj 20117/2008).

Literatura / References

1. Booth J. Milk Progesterone Testing: Application to Herd Management. *J Dairy Sci* 1979; 62: 1829-34.
2. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2001; 60-61: 449-57.
3. Braun RK. Analysis of reproductive records using DHIA summaries and other monitors in large dairy herds. In: Morrow DA, Current Therapy in Theriogenology, 2 ed.: Saunders Co. Philadelphia, London, 1986, 414-18.
4. Đurđević Đ, Vuković D, Vaić D, Gvozdić D. Usporedno ispitivanje estrusa i ranog graviditeta u krava određivanjem koncentracije progesterone u mleku i serumu RIA I EIA metodama. *Vet. glasnik* 1990; 44(2): 157-64.
5. Hoffman B, Gunzler O, Hamburger R, Schmidt W. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany, *British Vet J* 1976; 132(5): 469-76.
6. Jovičin M, Petrujković T, Milovanović A, Dujaković M, Žikić D. Analiza faktora koji utiču na tok estralnog ciklusa visokomlečnih krava. *Vet. glasnik* 2003; 57(3-4): 209-23.

7. Kovačević R, Krsmanović L, Marić D, Perkucin R, Veselinović S: Investigation of hormone profiles in dairy cattle with a view to controlling fertility and increasing reproductive efficiency. In Proceedings of the coordination meeting on isotope aided studies on livestock productivity in Mediterranean and North African countries, Rabat, 255-74, 1988.
8. Kuzmanov D, Đurđević Đ, Stojić V, Vujošević J. Neke karakteristike nivoa progesterona u mleku krava za vreme estrusa i rane faze graviditeta u farmskim uslovima držanja. Vet. glasnik 1981; 35(11): 1161-6.
9. Laing JA, Heap RB. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. Brit Vet J 1971; 127: xix.
10. Larson SF, Butler WR, Currie W B. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. J Dairy Sci 1997; 80(7): 1288-95.
11. Samad HA, Ahmad NB, Rehman NU Ahmad I. Use of milk progesterone assay for monitoring oestrus and early pregnancy in nili-ravi buffaloes. Pakistan Vet J 2004; 24(3).
12. Short RV. Progesterone and related steroids in the blood of domestic animals. Ciba Found. Colloquia on Endocrinology 1957; 2: 362.
13. Shrestha HK, Nakao T, Higaki T, Suzuki T, Akita M. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high producing Holstein cows. Theriogenology 2004; 61, 637-49.
14. Sturman A, Oltenacu B, Foote H. Importance of inseminating only cows in estrus. Theriogenology 2000; 53(8): 1657-67.
15. Reimers TJ, Smith RD, Newman SK. Management Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows in the Northeastern United States. J Dairy Sci 1985; 68(4): 963-72.
16. Robertson HA, Sarda IR. A very early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow. J Endocrinol 1971; 49: 407-19.
17. Vučko M, Potočnjak M. Otkrivanje estrusa kod krava mjerenjem električnog otpora vaginalne sluznice i određivanje progesterone u serumu krvi. Vet. glasnik 1988; 42(9): 561-6.
18. Vuković D, Đurđević Đ, Vajić D, Gvozdić D. "Target" (progesteronski brzi test) Tačnost u otkrivanju estrusa i ranog graviditeta krava. Vet. glasnik 1991; 45(6-7): 439-44.
19. Nakao T, Sugihashi A, Saga N, Tsunoda N, Kawata K. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. Am J Vet Res 1983; 44: 888-90.
20. Wimpy TH, Chang CF, Estergreen VL, Hillers JK. Milk Progesterone Enzyme Immunoassay: Modifications and a Field Trial for Pregnancy Detection in Dairy Cows. J Dairy Sci 1986; 69, 1115-21.

ENGLISH

APPLYING ENZYME IMMUNOTEST FOR DETERMINATION OF PROGESTERONE CONCENTRATION IN WHOLE COW'S MILK

A. Milovanović, M. Jovičin, T. Barna, Snežana Golubović, V. Resanović, V. Rodić, Smiljka Kitanović, M. Lazarević

In this work the possibility of producing and using our new EIA (enzyme immuno-sorbent test) set for direct determination of progesterone concentration in whole milk was analyzed.

The test confirmed high values in milk of confirmed gravid cows ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) and confirmed non-gravid cows ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n=8$).

This progesterone test helps following variations of progesterone concentration in blood and milk cow samples taken every second day. The progesterone concentration of gravid and low values of non-gravid cows are displayed, as well as errors in cycles and mistakes in insemination. The results were compared to the results obtained by the RIA progesterone test done on blood sera samples.

Progesterone concentration measured with EIA test in 15 milk samples was compared to the values of progesterone obtained by a commercial EIA test. The differences were not statistically significant (t-test, $t=0.1144$; $p=0.9097$).

After milking, the samples were stored for 28 days at 4°C , conserved by potassium dichromate, and a loss of progesterone activity by $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) was noticed, but in the final outcome this did not influence the clinical results. Accordingly, milk samples with preservative may be stored in a refrigerator for four weeks.

Key words: progesterone, EIA, milk, cows

РУССКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНЗИМНОГО ИММУНОТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОГЕСТРОНА В ЦЕЛЬНОМ КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ

А. Милованович, М. Йовичин, Т. Барна, Снежана Голубович, В. Ресанович, В. Родич, Смилька Китанович, М. Лазаревич

В этой работе показаны результаты применения нашего нового ферментного иммуносорбент теста (ЭИТ) для прямого определения концентрации прогестерона в цельном молоке коров.

Тестом подтверждены высокие концентрации в молоке у стельных коров ($13,16 \pm 13,29$ нг/мл; $n=10$) и низкие концентрации у нестельных коров ($1,35 \pm 0,98$ нг/мл; $n=8$).

Этим тестом прогестерона, в образчиках молока, могут надёжно следить варьирования в концентрации прогестерона по дням цикла коров, если образчики берутся каждого второго дня. В работе показаны профили прогестерона стельных и нестельных коров, словно и профили у нарушенных циклов и у ошибок в осеменении. Результаты, полученные ЭИТ тестом сравниваны с результатами,

полученными коммерческими РИА-сетом прогестерона из образчиков кровяного сыворотки.

Разницы в концентрации прогестерона в 15 образчиках молока коров новопроизведённым ЭИТ тестом и концентрации, определённой коммерческим ЭИТ тестом не были статистически значительные (t-тест: t=0,1144; p=0,9097).

В образчиках молока, храненных на температуре холодильника (+4°C), консервированным калия бихромат (до 28 дней после дойки) установлены более низкие концентрации прогестерона за $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ нг/мл) в отношении концентрации в день дойки, что в крайнем исходе всё таки не влияло на полученные клинические результаты. Для применения в ЭИТ тесте образчики молока с консервантом могут складироваться четыре недели в холодильнике.

Ключевые слова: прогестерон, ЭИТ, молоко, коровы